

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200326121

_____UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

日本对虾细胞凋亡相关基因PjCaspase的功 能研究

Functions of apoptosis-related PjCaspase gene from *Peneaus japonicus*

王磊

指导教师姓名: 章晓波 研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月

论文答辩日期: 2006 年 月

学位授予日期: 2006 年 月

答辩委员会主席 _____

评 阅 人 _____

2006 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声名

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内 打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
1 前言	3
1.1 我国对虾养殖的现状	3
1.2 对虾的免疫系统	3
1.2.1 对虾的免疫器官	3
1.2.2 对虾的免疫细胞	4
1.3 对虾的免疫机理	5
1.3.1 屏障和滤过作用	5
1.3.2 细胞免疫	6
1.3.3 体液性免疫	6
1.4 Caspase 蛋白酶家族	9
1.4.1 Caspase 蛋白酶的结构	10
1.4.2 Caspase 蛋白酶原的活化机制	12
1.4.3 Caspase蛋白酶家族在细胞凋亡过程中的位移	14
1.4.4 Caspase蛋白酶家族的调控	15
1.4.5 Caspase蛋白酶家族介导的细胞凋亡途径	17
1.5 RNAi 的作用机理及其应用	18
1.5.1 RNAi的作用机理	19
1.5.2 RNAi 的应用	21
1.6 本论文研究的目的和意义	22
2 材料方法	24
2.1 材料	24
2.1.1 试验用材料、细胞、菌株和质粒	24
2.1.2 主要试剂	24
2.1.3 引物	25

2.1.4 主要仪器设备	25
2.1.5 溶液的配制	25
2.2. 方法	29
2.2.1 对虾 <i>Caspase</i> 基因全长 cDNA 的克隆.....	29
2.2.2 对虾 <i>Caspase</i> 基因内含子的扩增.....	35
2.2.3. 对虾 <i>caspase</i> 基因启动子的扩增及功能验证.....	36
2.2.4 对虾 <i>Caspase</i> 基因的重组表达、蛋白质纯化和多克隆抗体制备...	39
2.2.5 对虾 <i>Caspase</i> 基因在对虾体内的转录、翻译分析	43
2.2.6 对虾 <i>Caspase</i> 基因表达与病毒刺激的关系	45
2.2.7 RNAi 研究对虾 <i>Caspase</i> 的功能.....	46
2.2.8 对虾 <i>Caspase</i> 互作蛋白.....	51
2.2.9 日本对虾 <i>Caspase</i> 基因多样性.....	51
3 结果与分析	52
3.1 对虾 <i>capase</i> 基因的功能研究.....	52
3.1.1 <i>PjCaspase</i> 的基因结构.....	52
3.1.2 <i>PjCaspase</i> 的重组表达与活性测定.....	57
3.1.3 <i>PjCaspase</i> 基因在对虾体内的转录表达分析.....	60
3.1.4 病毒刺激与 <i>PjCaspase</i> 表达的关系.....	63
3.1.5 <i>PjCaspase</i> 在细胞凋亡中的作用.....	64
3.1.6 与 <i>Caspase</i> 互作的对虾蛋白.....	70
3.2 对虾 <i>Caspase</i> 基因多样性的初步研究.....	71
3.2.1 对虾 <i>caspase</i> 基因多样性.....	71
3.2.2 抗病虾中 <i>PjCaspase</i> 的基因多样性.....	74
4 讨论.....	76
5 小结与展望	78
已经发表和待发表的论文.....	79
参考文献.....	80
致谢.....	88

Contents

Chinese abstract	1
English abstract	2
1 Introduction	3
1.1 Shrimp culture in China	3
1.2 The immune system of shrimp	3
1.2.1 The immune organs of shrimp.....	3
1.2.2 The immune cells of shrimp.....	4
1.3 The mechanism of shrimp immunity	5
1.3.1 Barrier and filtration effects.....	5
1.3.2 Cell immunity	6
1.3.3 Humour immunity	6
1.4 The Caspase protein family	9
1.4.1 The structure of Caspase.....	10
1.4.2 The activation of Caspase.....	12
1.4.3 The transfer of Caspase in apoptosis.....	14
1.4.4 The regulation of Caspase.....	15
1.4.5 Caspase-related apoptosis.....	17
1.5 The mechanism and application of RNAi	18
1.5.1 The mechanism of RNAi.....	19
1.5.2 The application of RNAi.....	21
1.6 The purpose and signification of this study	22
2 Materials and methods	24
2.1 Materials	24
2.1.1 Materials, cell line, bacteria and plasmids.....	24
2.1.2 Main reagents.....	24

2.1.3 Primers.....	25
2.1.4 Apparatus.....	25
2.1.5 Solutions and Buffers.....	25
2.2 Methods	29
2.2.1 Cloning of full-length cDNA of shrimp <i>Caspase</i> gene.....	29
2.2.2 Introns of <i>PjCaspase</i> gene.....	35
2.2.3 Promoter of <i>PjCaspase</i> gene.....	36
2.2.4 Recombinant expression, purification and activity of <i>PjCaspase</i>	39
2.2.5 Transcription and expression of <i>PjCaspase</i> in shrimp <i>in vivo</i>	43
2.2.6 Relationship between <i>PjCaspase</i> and WSSV infection.....	45
2.2.7 Function identification of <i>PjCaspase</i> by RNAi	46
2.2.8 GST pull-down assay.....	51
2.2.9 Gene diversity of <i>PjCaspase</i>	51
3 Results and analyses.....	52
3.1 The function of <i>PjCaspase</i>.....	52
3.1.1 The gene structure of <i>PjCaspase</i>	52
3.1.2 Recombinant expression and activity analysis of <i>PjCaspase</i>	57
3.1.3 Transcription and translation of <i>PjCaspase</i> in shrimp.....	60
3.1.4 Effect of WSSV infection on <i>PjCaspase</i>	63
3.1.5 Function analysis of <i>PjCaspase</i> by RNAi.....	64
3.1.6 Proteins interacted with caspase.....	70
3.2 Gene diversity of <i>PjCaspase</i>	71
3.2.1 Gene diversity of shrimp caspase.....	71
3.2.2 Caspase gene diversity in WSSV-resistant shrimp.....	74
4 Discussion.....	76
5 Summary and perspective	78
Publications.....	79

References	80
-------------------------	----

Acknowledgements	88
-------------------------------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

对虾是最重要的海水养殖产品之一，但是自从 1990 年代以来，一直受到病害的严重威胁，尤其是对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)，已成为危害对虾养殖的最主要病原。因此，充分了解对虾的非特异性免疫系统，从而探索对虾病害防治的新途径具有重要意义。本实验室在以前的研究中，通过抑制差减杂交 (SSH) 发现了日本对虾中一段与细胞凋亡相关的基因序列，为了进一步了解该基因在对虾抗病毒免疫中的作用，本论文开展了该基因的功能研究，以期对对虾病毒病的防治提供依据。

通过 5' 和 3' RACE 技术，从日本对虾中获得了该基因的 cDNA 全长，它含有一个预测的开放阅读框(ORF)，长度为 1524bp，编码 508 个氨基酸，与 caspase 蛋白酶家族具有同源性，因此将其命名为 PjCaspase 基因。相应的 DNA 分析发现，PjCaspase 基因含有两个内含子，三个外显子。采用 Genome walker 技术获得了该基因的启动子，并进一步验证了其功能。

将 PjCaspase 基因克隆至原核表达载体 pGEX-4T-2 中，获得了重组蛋白。研究表明，纯化的重组蛋白具有蛋白酶活性，证明 PjCaspase 具备 Caspase 的基本性质。通过 RT-PCR、Northern blot 和 Western blot 等分析发现，该基因在除心脏外的其他组织中均有转录表达。

用 WSSV 病毒刺激后，在不同时间提取病毒对虾和抗病对虾肝胰腺总 RNA，进行 Real-time PCR 分析，结果发现 PjCaspase 基因在抗病对虾中上调表达，说明该基因参与了对虾抗病毒的免疫过程。为了进一步了解 PjCaspase 在细胞凋亡中的作用，采用 RNAi 技术抑制 PjCaspase 基因的表达。结果表明，当 PjCaspase 基因的转录表达受到抑制时，对虾的细胞凋亡也受到抑制，这说明 PjCaspase 基因直接参与细胞凋亡。

本论文初步研究发现，对虾 Caspase 具有基因多样性，抗病对虾中 Caspase 蛋白序列的变化，低于正常对虾。

关键词：Caspase 基因，细胞凋亡，基因多样性

Abstract

Shrimp is one of the most important species in aquaculture, but it has been blocked by diseases caused by white spot syndrome virus (WSSV) in the world since 1990's. So it is important to study the innate immunity of shrimp and explore new approaches against the diseases. In our previous study, a fragment of a cDNA related to apoptosis was obtained in *Peneaus japonicus* by SSH. To further realize its role in shrimp antiviral immunity, in this investigation, this gene was characterized, which would be helpful for shrimp disease control.

The full-length cDNA was obtained with 5' and 3' RACEs in *Peneaus japonicus*. It contained an open reading frame (ORF) of 1524bp encoding 508 amino acids, which was homologous with caspase protein family. This ORF was named as PjCaspase gene. Its DNA sequence revealed that PjCaspase gene contained 2 introns and 3 exons. Its promoter was obtained using genome walker kit and further confirmed by functional analysis.

After cloning of PjCaspase gene into prokaryotic vector pGEX-4T-2, the fusion protein was obtained, which presented enzyme activity of caspase. This gene was transcribed and translated in all shrimp tissues except for heart as revealed by RT-PCR, Northern blot and Western blot.

Total RNAs of hepatopancreas from WSSV-infected and WSSV-resistant shrimp were extracted and subjected to real-time PCR. The results indicated that the PjCaspase gene was upregulated in WSSV-resistant shrimp, suggesting that it was involved in the shrimp antiviral immunity. To further realize the role of PjCaspase in apoptosis, RNAi was used to silence the *PjCaspase* gene. The results showed that the apoptosis was inhibited when the transcription of PjCaspase was inhibited, indicating that this gene played a very important role in apoptosis.

In this preliminary study, it was found that the PjCaspase gene presented gene diversity. The gene diversity in WSSV-resistant shrimp was

less than that in normal shrimp.

Keywords: Caspase, apoptosis, gene diversity

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前言

对虾由于其味道鲜美，营养丰富，受到人们的喜爱，自上世纪 80 年代以来，世界对虾养殖业迅猛发展，虾类的人工养殖获得了很大的收益。但是，从 90 年代初期开始，随之而来的对虾疾病的爆发却给对虾养殖造成了极大的危害，考虑到使用抗生素等药物有安全性和抗药性等方面的问题，因此研究对虾的免疫机制，利用对虾自身的抗病因子提高抗病能力，是解决病害问题的一条非常有效的途径。

1.1 我国对虾养殖的现状

世界对虾养殖业自 50 年代以来由于其需求量的日益增加而发展迅速，对虾产量每年的增长幅度达到了 7-9%^[1]。我国对虾养殖业虽发展较晚，是近 20 年才发展起来的，但却已成为养殖业中最具经济价值的产品之一。我国当前的对虾养殖品种主要有日本对虾 (*Penaeus japonicus*)、南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 等^[2]。然而，上世纪 90 年代初对虾疾病的爆发，尤其是对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV) 的爆发，给全球的对虾养殖业造成了极大的经济损失。到目前为止，对于 WSSV 仍然没有有效的防治方法，它仍然是对虾养殖业的头号威胁。

1.2 对虾的免疫系统

免疫系统是生物抵御异物入侵的防御机构，由具有免疫功能的器官、组织、细胞、免疫效应因子和有关的基因组成，保护机体免受病原体和有害异物的侵害。一般认为，无脊椎动物的免疫系统只生成原始的、非特异性的防御系统^[3]。对虾的免疫系统主要包括免疫器官、免疫细胞和各种免疫因子。免疫器官包括甲壳、鳃、血窦和淋巴器官等，免疫细胞包括血细胞和淋巴细胞^[4]，免疫因子指各种与免疫相关的分子。

1.2.1 对虾的免疫器官

虾类的免疫器官包括甲壳、鳃、血淋巴和淋巴器官^[5,6]。对虾的甲壳由外到

内依次是表皮层、外皮层、内皮层和内膜层，其主要成分是几丁质及其结合钙，甲壳在对虾的非特异性免疫过程中起机械阻挡作用。对虾的鳃由鳃轴、主鳃丝、二级鳃丝组成，其腔中充填着可以自由流动的血淋巴，在对虾免疫过程中可以起到滤过病毒或致病菌的作用。由于对虾的血液循环是开放式循环，体液和血液混在一起，因此对虾的血液又被称作血淋巴。淋巴器官位于虾体胃的腹侧，左右 1 叶，长约 5-7mm，为膜包被的管状结构，由内皮细胞、基质细胞和血细胞 3 种细胞组成。淋巴器官为一造血器官，能产生无颗粒细胞和颗粒细胞。对虾血窦实质上就是充满血淋巴的腔，大小血窦遍布全身，血窦在免疫过程中也和腮一样是起滤过作用。

1.2.2 对虾的免疫细胞

无脊椎动物没有完善的细胞免疫机制，其细胞防御主要是对“异己”的识别与排斥。对虾的免疫细胞主要是血淋巴中的血细胞，还有淋巴细胞。

1.2.2.1 血细胞

国内外文献有关虾的血细胞分类均依据颗粒的有无和大小作为依据。中国对虾血细胞根据颗粒的大小及有无，可分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。透明细胞呈卵圆形，只有少量呈球形，表面光滑，细胞器少，由于电子密度低而呈透明状。小颗粒细胞为卵圆形或纺锤形，胞质中有大量的线粒体和核糖体，特征性结构是胞质中有大量体积小的高电子密度的颗粒，它在防御反应中具有活跃的胞吐作用和识别异物的能力，是防御的关键细胞。大颗粒细胞体积最大，呈卵圆形，特征性结构是胞质中有较多体积大的颗粒，颗粒由单位膜包被，其间充满均质的高电子密度物质，它没有吞噬能力，但活化的酚氧化酶系统组分，可迅速使之发生胞吐作用释放出有活性的酚氧化酶参与体液反应。对虾血细胞中还存在一类“浆样细胞”，它不含特殊颗粒，而是在细胞质内充满以细胞核为轴心呈圈状排列的粗面内质网，同时含有丰富的多聚核糖体和发育良好的高尔基复合体，因而能够旺盛合成分泌性蛋白，这类似于哺乳动物的浆细胞。在病毒或与细菌混合感染的对虾组织中，浆样细胞不仅数量最多，而且内质网呈扩张状态，这说明对虾体内某些细胞可能会合成原始的免疫球蛋白^[7]。

1.2.2.2 淋巴细胞

对虾的淋巴细胞主要指淋巴样器官中的细胞, 包括淋巴细胞 A、淋巴细胞 B 和淋巴细胞 C。淋巴细胞 A 呈圆形, 直径 10–12 μm , 细胞核约占整个细胞的 3/4, 它是最主要的淋巴细胞, 占淋巴细胞总数的 60%左右, 有很强的吞噬活性。淋巴细胞 B 呈圆形, 直径 9–11 μm , 成熟后多为椭圆形, 占淋巴细胞总数的 35%左右。淋巴细胞 C 呈圆形或不规则形, 直径 20–30 μm , 是最大也是数量最少的一种淋巴细胞, 占总数的 5%左右。

1.3 对虾的免疫机理

无脊椎动物的免疫研究起步较晚, 而有关对虾的免疫研究从上世纪 80 年代才逐步开展。目前, 有关对虾的免疫研究成果和发现主要集中在虾的非特异性免疫, 已有的研究分为两种, 一种是体液免疫, 主要包括了血淋巴的溶菌作用、凝集作用, 机体对脊椎动物红细胞的溶解作用及血淋巴中与免疫相关的一些酶类。另一种是细胞免疫, 指血淋巴中血细胞对异物的吞噬、杀死和排除作用。虾的免疫是由甲壳的阻挡作用构成机体的第一道防线, 当异物突破第一道防线后经食道、鳃等与外界相通的器官或体腔进入机体后, 通过血淋巴的循环进行滤过作用, 这种滤过作用将异物固定在一定的组织器官内, 以免扩散。最后在血细胞、淋巴细胞、血清免疫因子的联合作用下, 这些部位的病原或异物被杀死、清除或随蜕皮排出体外, 达到抗感染或免除疾患的目的。

1.3.1 屏障和滤过作用

虾的甲壳除了具有支持机体充当外骨骼的作用外, 还象人的皮肤一样, 具有阻挡异物的功能, 在免疫过程中充当第一道防线。同时蜕皮也是虾排除体内和体表异物的重要途径, 是虾抵抗病原菌感染和自洁的有效方法。起滤过作用的主要是鳃、血窦和淋巴器官。进入机体的大分子和微生物, 通过血淋巴液的流动而被滤在鳃血窦和鳃丝末端膨大的结构中, 此时鳃丝腔中的血细胞游走到顶端囊状结构中进行吞噬作用, 清除异物或与蜕皮一同蜕掉。虾的血窦在全身形成网络, 进行动静脉血的交换, 交换的过程中异物被限制在血窦中, 引起血窦内血细胞数量增加, 血细胞吞噬作用增强。吞噬后的产物、毒物在蜕皮时蜕去^[8], 从而起到抗感染或免除疾患的作用^[9]。相比前两种滤过作用, 淋巴器官的滤过作用则表现为

专一的滤过杀菌功能，吞噬后的残余物是通过输出淋巴管被排到肝胰脏。

1.3.2 细胞免疫

细胞免疫主要是血淋巴中的血细胞和淋巴器官中的淋巴细胞的吞噬作用。由于对虾缺乏特异性免疫, 因此血细胞在对虾的非特异性免疫防御反应中起着主要作用。它们通过吞噬、包囊、形成肉芽肿等防御反应清除固定在血窦中的异物。由于对虾血细胞没有系统的分类, 吞噬过程中又发生形态及生理的变化, 到目前为止还不能完全确定对虾各种血细胞在吞噬过程中的具体作用。一般认为, 透明细胞专营吞噬异物; 小颗粒细胞主要负责通过脱颗粒吸附在异物表面等过程来识别异物作出应答并参与对异物颗粒的吞噬^[10, 11], 同时也参与包囊反应^[12]; 大颗粒细胞也具有吞噬作用, 但其吞噬作用较小颗粒细胞不显著, 其最重要的功能是在免疫防御中具有抗菌杀菌活性^[13], 通过脱颗粒释放酚氧化酶原, 从而激活酚氧化酶系统^[14]。淋巴细胞具有比血细胞更强的吞噬活性, 病原被滤入淋巴样器官后, 进入淋巴小管的腔中, 淋巴因子受趋化作用游出基底膜大量进入管腔进行吞噬, 淋巴细胞的吞噬过程与血细胞基本相似^[5, 15, 16], 大致可分为趋化、吸附、吞入和消化杀菌四个阶段。病原入侵后, 被血清因子(一种糖蛋白)识别, 异物可能被带上标记, 从而引起吞噬细胞对其进行吸附, 然后伸出伪足, 或者形成凹陷将异物吞噬。血细胞或淋巴细胞将吞入的异物分解, 同时自身也大多解体。抵抗小的微生物入侵的吞噬作用通常是由单个吞噬细胞完成的, 而当入侵病原太大或太多不能被单个细胞消化时, 则有更复杂的结节形成(nodule formation)和包囊作用(encapsulation)。结节是血细胞聚集体, 它们通常被酚氧化酶所黑化。包囊作用与结节形成相似, 但作用于更大的入侵者, 如真菌、线虫、寄生虫的卵或幼虫^[17]。

1.3.3 体液性免疫

对虾的体液性免疫因子在其免疫防御反应中发挥着十分重要的作用, 这些因子包括天然形成或诱导产生的各种生物活性分子, 主要是血淋巴中的各类抗菌因子、抗病毒因子、凝血因子、细胞激活因子、识别因子、凝集素、溶血素、溶菌酶及各种具有免疫活性的酶类和酶抑制剂。这些免疫因子的作用在于识别异物,

包括外来入侵的病原菌和病毒；通过凝集、沉淀、包囊、溶解等方式抑制病原体的生长及扩散，或者直接将其杀灭并排出体外；发挥调理作用，促使吞噬细胞更易于吞噬外来颗粒；另外，还可能参与止血、凝固、物质吸收与运输以及创伤修复等生理作用^[18]。

1.3.3.1 凝集素

一般认为在无脊椎动物体液中没有免疫球蛋白等高度特异性的免疫因子，因此无脊椎动物不能通过抗原抗体结合反应来清除外界异物分子。凝集素作为一种重要的体液免疫因子，在对虾等无脊椎动物的体液反应中起着极为重要的作用^[19]。凝集素拥有专一性受体识别因子，它们通过与糖蛋白或糖脂相互作用凝集细胞或沉淀糖缀合物的碳水化合物结合蛋白或糖蛋白。凝集素的这种专一性识别类似于脊椎动物的免疫球蛋白，由此可以推测在缺乏免疫球蛋白的无脊椎动物体内，是依赖凝集素完成抗原与防御系统的识别的。甲壳动物的凝集素主要有两种：一种是存在于血清中的可溶性凝集素，可以同异物分子表面的糖基决定簇发生结合，从而导致异物颗粒的凝集；另一种存在于透明细胞等血细胞里或结合在细胞膜表面，血细胞可以通过这种凝集素分子对异物分子进一步吞噬或包囊，但目前尚不十分明确这些细胞膜结合凝集素是真正的膜整合蛋白分子，还是仅仅由血细胞吸附的一些血清成分。可能是血细胞合成产生了凝集素，一部分分泌到血清中，另一部分则整合在血细胞的细胞膜上^[20, 21, 22]。凝集素的确切作用和免疫地位目前尚不十分清楚，在对外来入侵异物进行的识别、防御、凝集、吞噬、包囊及其随后的创伤修复等一系列反应中，凝集素协同其它各种免疫因子共同发挥作用，其主要作用可能是使血淋巴中的异物分子发生凝集，从而使这些病原体丧失进一步侵染机体和在组织中扩散的能力，以达到免疫防御的目的^[23]。另外，血淋巴中凝集素还具有重要的调理作用，可以将结合的异物分子传递给血细胞，由血细胞来完成最终的吞噬和杀灭作用，从而大大增强血细胞的吞噬作用^[24]。

1.3.3.2 溶血素

溶血素也是无脊椎动物免疫防御系统中的一种重要的非特异性免疫因子，其作用可能类似脊椎动物的补体系统，可溶解破坏异物细胞，参与调理^[25]，并可能与无脊椎动物体液的杀菌作用以及 proPO 激活系统有关^[16]，由于其在免疫防御中发挥着重要的作用，因此其活性也被用来检测对虾等甲壳类动物健康状况的一项定量指标。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库